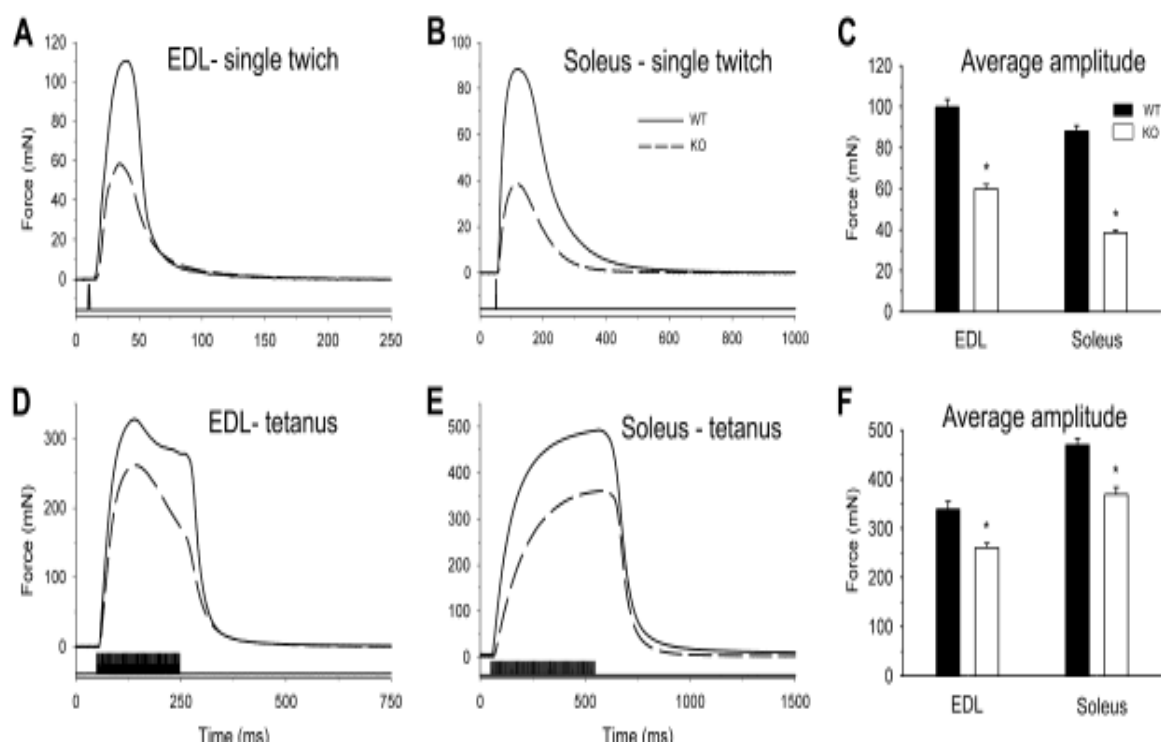


The role of surface membrane and sarcoplasmic reticular proteins in acquired and hereditary muscle disorders

A triadin szerepe a szarkoplazmatikus retikulumból történő kalcium-felszabadulás folyamatában harántcsíkolt izmon

A szarkoplazmatikus retikulum (SR) kalcium csatornája (ryanodin-receptor, RyR) több különböző fehérjével is kölcsönhatásban áll, többek között a calsequestrinnel (CSQ), a junctinnal, a mitsuguminokkal és a triadinnal. Az SR membránfehérjék e csoportjából először a triadint fedezték fel. Elsőként nyúl vázizom triádjából mutatták ki a 95 kDa-os molekulásúlyú glikoproteint, majd szívizomban is igazolták a jelenlétét. Alternatív splicinggal többféle molekulásúlyú izoformája jöhet létre mindkét izomtípusban, ugyanakkor más szövettípusban eddig nem találták meg. A vázizom triadinoknak (Trisk) eddig négy izoformáját klónozták patkányból. Minden izoforma azonos, rövid citoplazmatikus N-terminális szegmentummal, transzmembrán α -hélixszel, és változatos hosszúságú, egyedi luminális C-terminális résszel rendelkezik. A triadinról először azt feltételezték, hogy a T-tubulus membrán kalciumcsatornája (DHPR) RyR-ral való összekötéséért, ezáltal az elektromechanikai kapcsolatért felelős. Saját munkánk és mások kutatásai alapján azonban már tudjuk róla, hogy a Ca^{2+} -felszabadulás szabályozásában vesz részt vázizomban és szívizomban egyaránt.

A rágcsáló vázizomban megtalálható triadinokat a molekulásúlyuk alapján nevezték el. A Trisk 95 (95 kDa molekulásúlyal), és rövidebb változatai, a Trisk 51, a Trisk 49 (49 kDa), és a Trisk 32. A funkciójuk felderítésére létrehozott triadin knockout (KO) egérről megmutattuk, hogy *in vivo* és *in vitro* is gyengébb volt (1. ábra), mint a kontroll egerek, de ez nem befolyásolta a túlélésüket. Megvizsgáltuk a kalciumhomeosztázisban résztvevő fehérjék expressziós szintjét és azt találtuk, hogy a gyors típusú harántcsíkolt izmokban nőtt a DHP receptorok száma miközben jelentősen csökkent a calsequestrin fehérje mennyisége. Elektron-mikroszkópos vizsgálatokkal a KO egerek izmaiban abnormálisan elhelyezkedő triád struktúrákat és a szarkoplazmatikus retikulum terminális ciszternáinak csökkent térfogatát találtuk. Megvizsgáltuk az izomerőt élő állatokon függeszkedési tesztekkel, elektromos ingerléssel kiegészített NMR analízissel és izolált izmokon elektromos ingerléssel. Minden eredmény a KO egerek izmainak gyengülését mutatta, ami bizonyítja a triadin fontos szerepét a harántcsíkolt izmok struktúrájának és funkciójának megőrzésében. Eredményeink megmutatták, hogy a triadin hiánya izom myopathiához vezethet és az általunk létrehozott állatmodellel ez jól tanulmányozható (Oddoux et al. 2009).



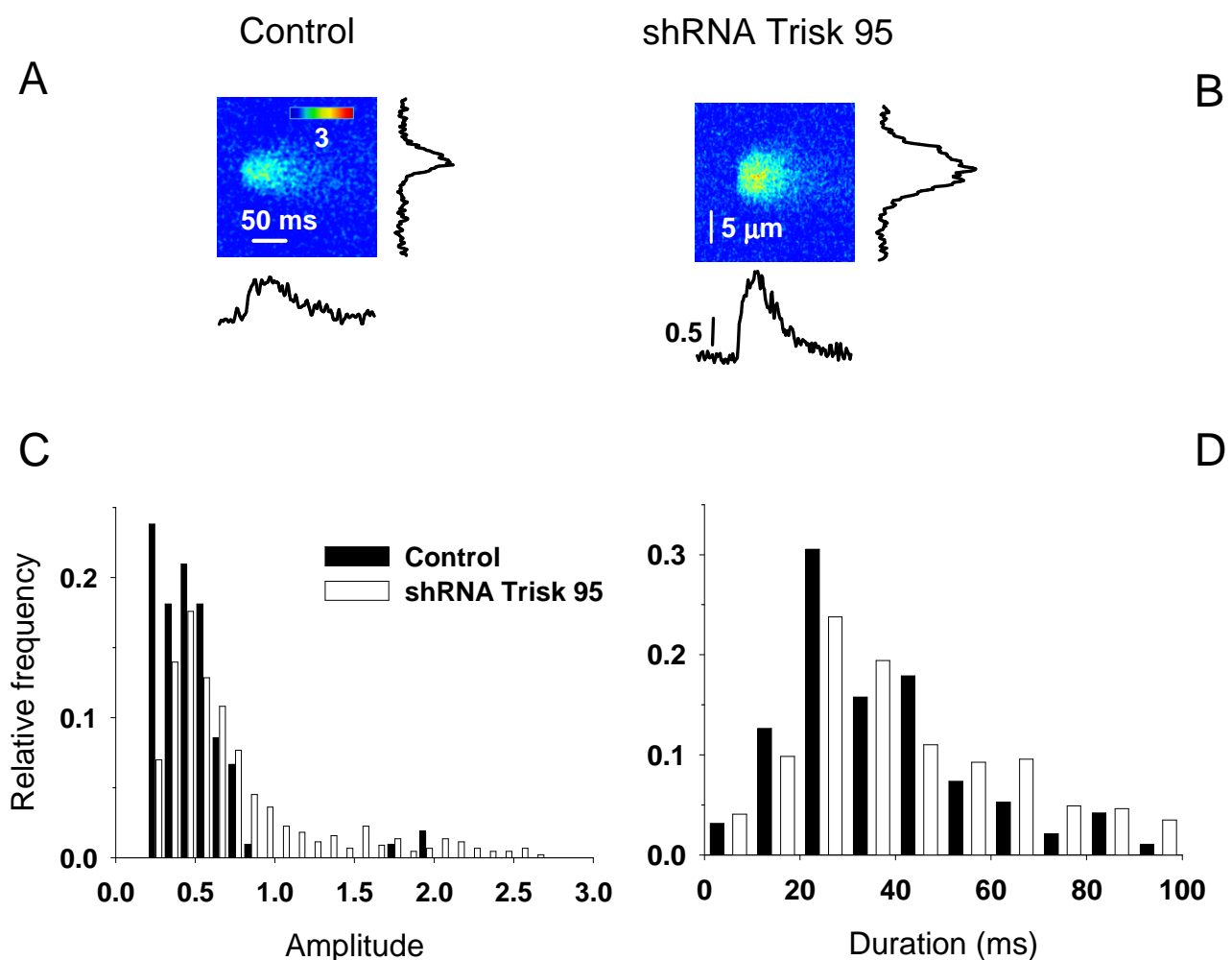
1. ábra Erő tranziensek kontroll (WT) és triadin KO egér izolált harántcsíkolt izmán.

A és B, egyedi összehúzódás 1 ms-os szupramaximális (5V) ingerléssel kiváltva EDL (A) és Soleus (B) izmokon (WT folytonos vonal; KO szaggatott vonal). D és E, tetanusz szupramaximális (5V) sorozatingerléssel kiváltva (200Hz 200 ms-ig EDL-en (D); 100 Hz 500 ms-ig Soleuson (E)). C és F, átlagolt adatok 5 db WT és 6 db KO egérből. * szignifikáns különbséget jelöl a WT és KO egerek között ($p < 0,05$).

Az emberi triadin gén 420 kb hosszú, amiből a leghosszabb, vázizomban előforduló izoforma, a Trisk 95, csak 2,2 kb-t tesz ki és az összes triadin mennyiségének kb. 40%-át adja. Az SR-ben, a triádokban található meg, és a RyR-ral és a CSQ-nel asszociálódik, ezáltal a Ca^{2+} -felszabadulásban részt vevő fehérjekomplexum fontos alkotója. Myoblastokban, szatellitasejtekben nem mutatható ki. A differenciálódás során a myotubulusokban kezd erősebben expresszálni és harántcsíkolt festődést mutat.

Mi munkánkban az elemi kalcium felszabadulási eseményeket (ECRE) és a Ca^{2+} -tranzienseket tanulmányoztuk konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével C2C12 izomsejteken és primer vázizomtenyészeteken. Liposzóma és adenovírus mediált overexpressziót, valamint RNS-interferencia módszert alkalmaztunk a Trisk 95 fehérje expressziójának módosítására. A stabil overexpresszió csökkentette mind a Ca^{2+} sparkok amplitúdóját és frekvenciáját, mind a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket C2C12 sejtekben. Ehhez hasonlóan, a Trisk 95 adenovírus mediált overexpresszióját követően csökkent a spontán, egész sejtre kiterjedő Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és előfordulási gyakorisága is. Ugyanakkor az endogén triadinexpresszió shRNS-el történő gátlása ellentétes változásokat eredményezett. Kontroll, endogén Trisk 95-öt expresszáló patkány, primer vázizomtenyészetekben rendre megfigyelhetőek voltak spontán Ca^{2+} -tranziensek,

viszont ezen tenyészeteken sparkokat csak kis gyakorisággal találtunk. Az shRNS transzfekciót követően a Trisk 95-specifikus immunpozitivitás jelentősen csökkent. Ezen sejteken az ECRE-k jelentősen nagyobb gyakoriságot mutattak (2. ábra). Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a Trisk 95 fehérje negatívan szabályozza a RyR működését, azáltal, hogy csökkenti a Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket, valamint a globális Ca^{2+} -tranzienseket. Ezeknek az eredményeknek a magyarázata az lehet, hogy a triadin összeköti az SR-t és a Ca^{2+} -felszabadító komplexet a mikrotubulus hálózattal, ezáltal az SR és a triád struktúrájának fenntartásában is szerepe lehet, és a RyR-ra gyakorolt szabályozó szerepét e strukturális funkción keresztül fejtheti ki. Így a triadin expresszióváltozása az SR felbomlásához, és a RyR és a DHPR szétválásához vezethet (Fodor et al. 2009).



2. ábra Ca^{2+} sparkok paraméterei kontroll és csökkentett Trisk 95 expressziójú patkány primer myotubulusokban.

Tipikus Ca^{2+} spark kontroll myotubulusban (A) és csökkentett triadin expressziójú sejtben (B). C, Ca^{2+} sparkok amplitúdó histogrammja (143 db kontroll körülmények között és 649 db csökkentett Trisk 95 expresszió esetén rögzített esemény). D, Ca^{2+} sparkok hossz histogrammja.

A Trisk 32 egy 287 aminosavból álló fehérje, 32,1 kDa-os elméleti molekulatömegű. Az emberi triadin első nyolc exonja utáni alternatív splicing-gal keletkezik, és 23 aminosavból álló, egyedi C-terminális véggel rendelkezik. Ez az egyetlen olyan izoforma,

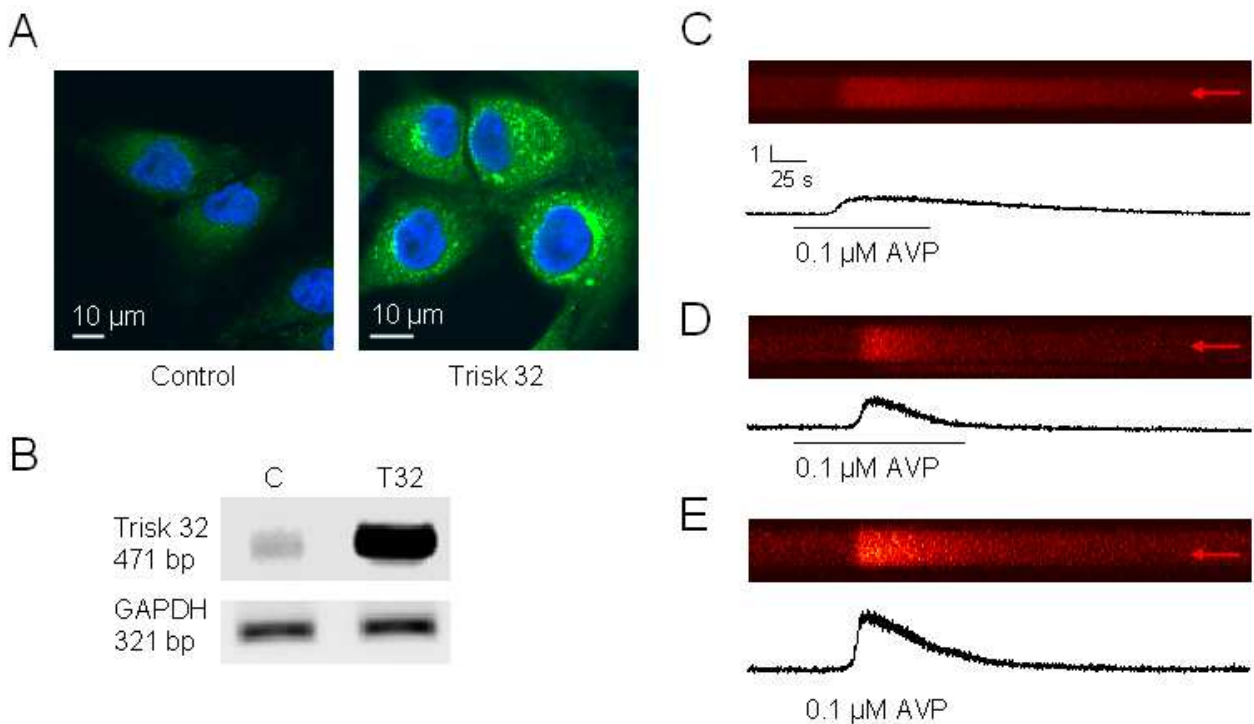
amely váz- és szívizomban is megtalálható. A Trisk 32 a többi izoformával ellentétben már myoblastokban is expresszálódik, differenciált izomcsövekben pontozott festődést mutat. Egérben és patkányban az összes triadin mennyiség 20%-át teszi ki, emberben nem mutatható ki. Nagyrészt nem a triádban, hanem az SR longitudinális tubulusában lokalizálódik – a Z-lemeznél összpontosul, azon a részen, ahol az IP₃R és a mitokondriumok is megtalálhatóak –, de kisebb mennyiségben az egész SR-ben megtalálható. Ezáltal nem kolokalizál a CSQ-nel, a Trisk 95-tel, a Trisk 51-gyel és a DHPR-ral, de kolokalizál a Ca²⁺-ATPázsal, a dezminnel és az IP₃R-ral.

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a Trisk 32-nek lehet-e szerepe az IP₃R szabályozásában – hasonlóan, ahogy a Trisk 95 részt vesz a RyR szabályozásában –, a fehérjét L6.G8 myoblastokban termeltettük túl. A Trisk 32-vel és az üres vektorral végzett transzfekció nem befolyásolta a sejtek életképességét, ugyanakkor mind az üres vektorral transzfektált, mind a Trisk 32-t túltermelő sejtek proliferációs képessége lecsökkent a kontrollhoz képest. Kimutattuk a Trisk 32 és az IP₃R kolokalizációját és közvetlen fizikai kapcsolatát a transzfektált sejtekben, valamint a funkcionális kapcsolatukat is bizonyítottuk. Az IP₃ útvonal aktiválásához bradykinint és arginin-vazopresszint használtunk.

Munkánk egyik fő felfedezése az, hogy a Trisk 32 overexpressziója szignifikánsan nagyobb amplitúdójú és felszálló meredekségű Ca²⁺-tranzienseket eredményezett az IP₃ útvonalon keresztül. E megfigyelésnek legalább négy különböző, ám funkcionálisan összefüggő magyarázata lehet. Az első lehetőség az, hogy a Trisk 32 megváltoztathatja a felszíni membrán receptorai és az IP₃ képzésével járó folyamatok kapcsolódását, ami miatt nagyobb mennyiségű IP₃ keletkezhet a transzfektált sejtekben. Második lehetőségként a Trisk 32 közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatással fokozhatja az IP₃R megnyílását a receptor agonistája jelenlétében. A harmadik lehetséges magyarázat az, hogy a Trisk 32 overexpressziója az ER Ca²⁺-tartalmának emelkedéséhez, és ezáltal nagyobb mennyiségű felszabadítható Ca²⁺-hoz vezethet. Végül, a Trisk 32 szabályozhatja az intracelluláris raktár ürülésének kapcsolódását az extracelluláris Ca²⁺ belépéséhez (SOCE), ami fokozott kalciumbelépést eredményezhet. Ezek mellett a RyR által mediált Ca²⁺-felszabadulásra gyakorolt, akár közvetlen, akár a felszabaduló Ca²⁺-on keresztüli közvetett hatása (Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás) sem zárható ki elméletben teljesen.

Arra is bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy az IP₃R aktivációja nem változik meg abban az esetben, ha a receptorokat közvetlenül, a jelátviteli útvonal kihagyásával stimuláljuk. Ezt az bizonyítja, hogy a thimerosal – egy széles körben használt, membránpermeábilis IP₃R agonista (Vanlingen et al. 2001, Biochem Pharmacol, 61:803) –

adagolást követő Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és felszállási meredeksége azonos mértékű volt a kontroll, üres vektorral transzfektált, és Trisk 32-t túltermelő sejtekben. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a Trisk 32-t túltermelő sejtekben az IP_3R konduktanciája nem változik meg (ezt megerősíti az is, hogy más, független bizonyítékaink arra utalnak, hogy a raktár Ca^{2+} -tartalma hasonló volt ezekben a sejtekben) (Oláh et al, 2011).



3. ábra A Trisk 32 overexpressziója L6.G8 myoblastokban

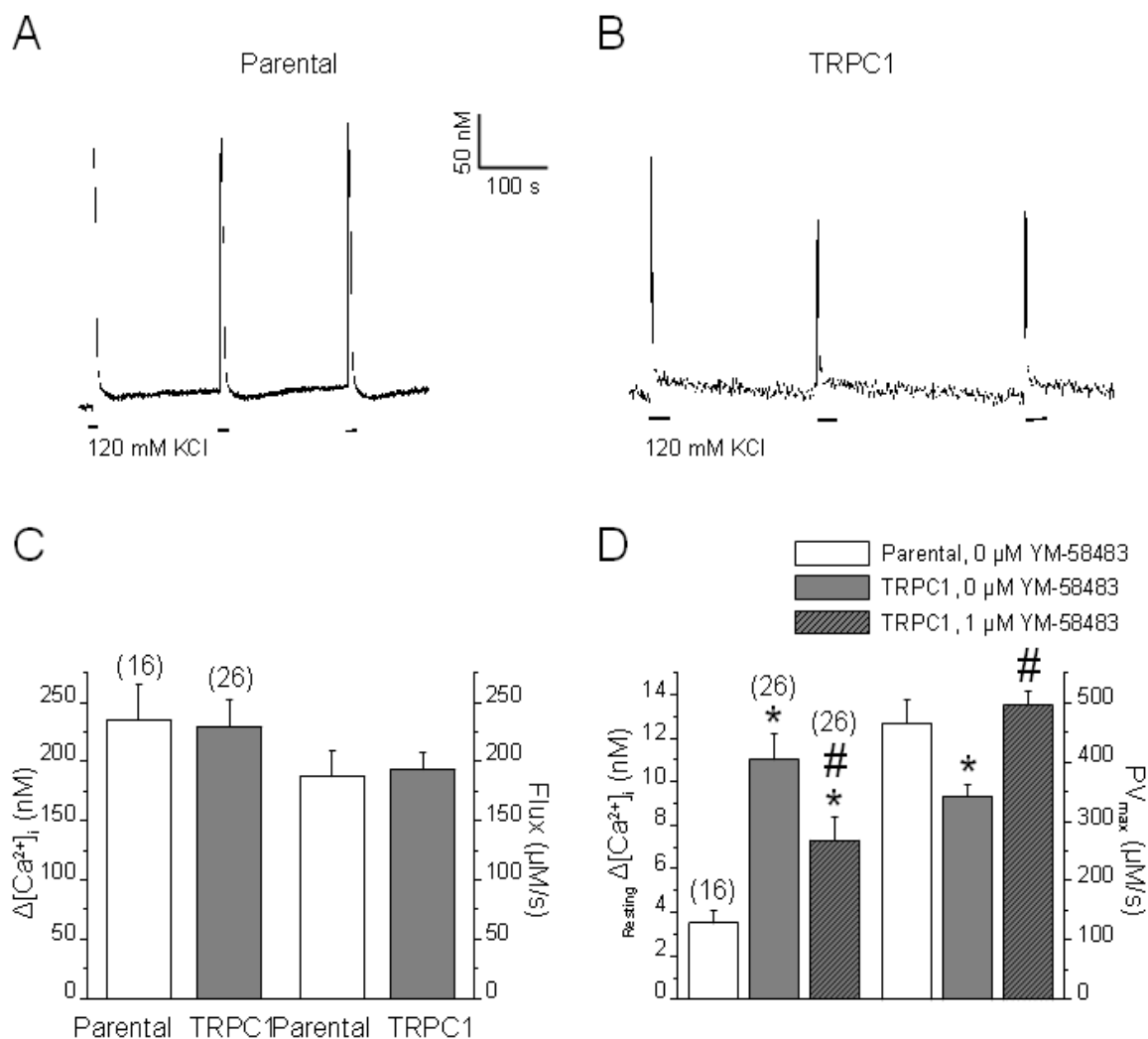
A, A Trisk 32 fehérje expressziója kontroll és Trisk 32-t túltermelő L6 sejtekben. B, Kontroll és transzfektált sejtekben a Trisk 32 mRNS-ét RT-PCR-rel detektáltuk. $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában, 0,1 μM arginin-vazopresszin (AVP) által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek line-scan felvételei kontroll (C), üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált (D), és Trisk 32-t túltermelő (E) myoblastokon.

A kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusának szerepe a szarkoplazmatikus retikulumból történő kalcium-felszabadulás folyamatában harántcsíkolt izmon

Munkánk következő részében bemutattuk, hogy differenciálódó izomsejtekben a kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1) overexpressziója a SOCE fokozódását okozza, ami a TRPC1 eltérő viselkedésére utal a kifejlett vázizomban leírtakhoz képest. Először szolgáltatunk bizonyítékot arra, hogy az overexpresszió hatása nem csak a szerhatásra bekövetkező raktárürülés utáni emelkedett Ca^{2+} -belépésben mutatkozik meg, hanem a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -jelek után megfigyelhető magasabb nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban is (4. ábra). Ráadásul a TRPC1 overexpressziója csökkentette a STIM1 és a SERCA expressziós szintjét, azonban a RyR-ét, a

calsequestrinét és az Orai1-et nem, ami a TRPC1 az előbbi molekulákkal történő kölcsönhatására utalhat az SR membránjában.

A belső Ca^{2+} -raktárak kiürítését követően a SOCE amplitúdója és felszálló szárának meredeksége szignifikánsan nőtt a TRPC1-et túltermelő myotubulusokban, ami a TRPC1 részvételét feltételezi a Ca^{2+} -belépésben.



4. ábra A TRPC1 overexpressziójának hatása a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre.

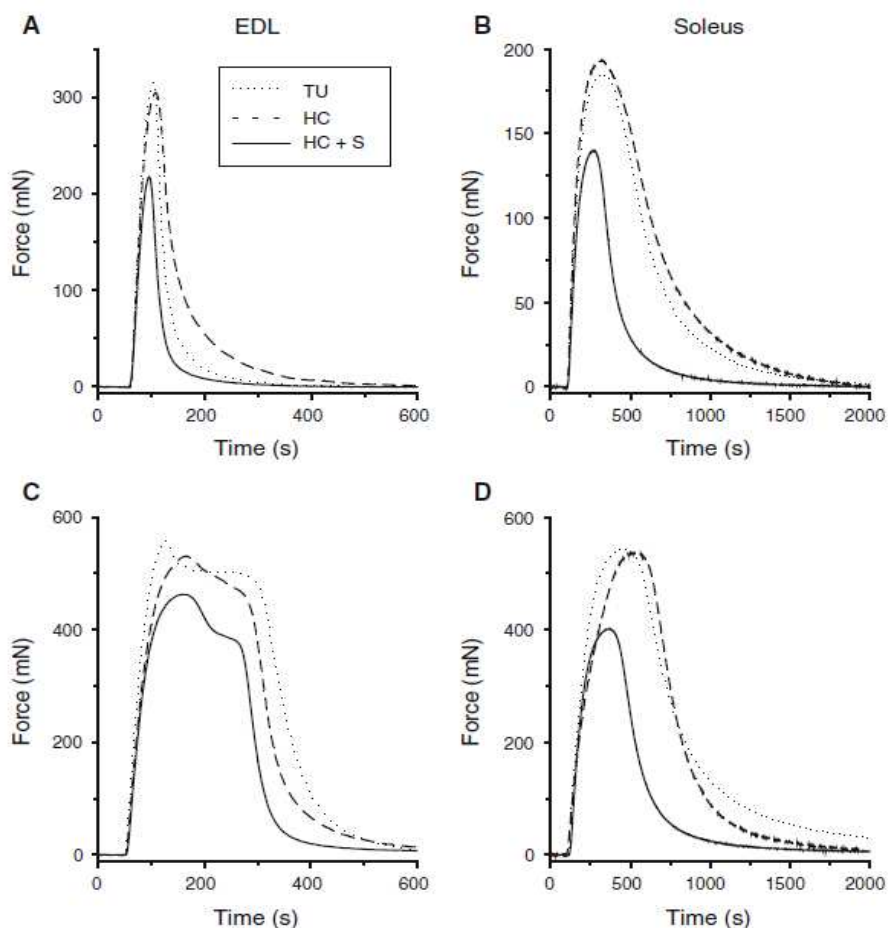
Ismételt 120 mM KCl adagolása által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív görbéi (A) kontroll és (B) TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusokon. (C) A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és a maximális Ca^{2+} -fluxus (a sejtekbe 1 másodperc alatt belépő Ca^{2+} mennyisége) kontroll és TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. (D) A tranziensek utáni nyugalmi Ca^{2+} -szint, és a SERCA pumpa aktivitásának megváltozása kontroll és TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. A KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket YM-58483-mal kezelt TRPC1-et túltermelő sejtekben is megvizsgáltuk. * a kontroll és a TRPC1-et túltermelő sejtek közötti, míg a # az YM-58483 jelenlétében és hiányában kapott adatok közötti szignifikáns különbséget jelöli. A zárójelben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Ez a fokozott SOCE kétféleképpen magyarázható. Az első lehetőség szerint a TRPC1 csatorna közvetlenül részt vett a belépési mechanizmusban. A második magyarázat az lehet, hogy az overexpresszió valahogy felerősítette a STIM1-Orai1 útvonal hatékonyságát. Az első lehetőség tűnik valószínűbbnek, mivel a STIM1 expresszió nem nőtt, hanem csökkent, ami csökkent STIM1-Orai1 kölcsönhatásra utal. Ezt az is megerősítette, hogy a megváltozott STIM1 expresszió funkcionális következménye is

megfigyelhető volt az YM-58483 alkalmazását követően. A szer gátolta a TRPC1 csatornákat, és így a SOCE feltételezhetően csak az Orai1 csatornákon keresztül mehetett végbe. Ilyen körülmények között a Ca^{2+} -belépés valamivel kisebb mértékű volt, mint a kontroll sejtekben, ami a STIM1-Orai1 útvonal gyengébb működésére utalhat a TRPC1-et túltermelő tenyészetekben. Másrészt a csökkent STIM1 expresszió ellenére a raktárürülést követően a STIM1 ponták továbbra is megfigyelhetőek voltak, ami arra utal, hogy a STIM1 aggregációja nem károsodott. Ezek alapján azt lehet feltételezni, hogy ha a TRPC1 csatornák a raktárürülés során valóban a STIM1 által aktivált „SOCE komplexum” részét képezik, akkor a TRPC1-et túltermelő sejtekben a csökkent STIM1 expresszió a sejtek kompenzációs válasza lehet a finoman szabályozott Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásáért. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a TRPC1 expressziójának növelése a SOCE fokozódását okozza. Ez negatív visszacsatolással szabályozza a STIM1-Orai1 rendszert és a SERCA aktiválódását, ami valószínűvé teszi ezen fehérjék együttműködését a Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában (Oláh et al, 2011).

Módosult vázizom működés hiperkoleszterinémiában és statin kezelést követően

Habár a statinok a legelterjedtebb és biztonságosnak tartott gyógyszerek a hyperlipidaemia kezelésében, egyre növekvő számban számolnak be a harántcsíkolt izmokon kifejtett mellékhatásaikról. Eddig állatmodell hiányában a statin okozta myopátiák nem voltak tanulmányozhatóak érdemben. Ezért kifejlesztettünk egy magas vér-cholesterol szinttel rendelkező patkány modellt a fluvastatin harántcsíkolt izomra kifejtett hatásának tanulmányozására. Ezekben az állatokban a vér cholesterol szintje a normális több, mint hétszeresére emelkedett ($1,5 \pm 0,1$ -ről $10,7 \pm 2,0$ mmol/l-re), amit az alacsony sűrűségű lipoprotein/nagy sűrűségű lipoprotein hányados drámai növekedése kísért. Míg az utóbbi növekedés kivédhető volt statin kezeléssel, a vér creatine kinase (CK) szint növekedése izompusztulásra utal. A *m. extensor digitorum longus* (EDL) izomrostjai átlagos keresztmetszeti felülete szignifikánsan csökkent a statin kezelt állatokban. A statin adagolása ugyancsak csökkentette az izom myotubulusok proliferációs és fúziós képességét sejtenyészetben. Ezzel párhuzamosan a nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) csökkent a statin kezelt szatellita sejtekben és myotubulusokban. Másrészt, a felnőtt állatokból izolált harántcsíkolt izomrostokban a statin kezelés növelte a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t (116 ± 4 nM-ről 151 ± 5 nM-ra), de csökkentette mind az egyedi rángások, mind a tetanuszok amplitúdóját EDL és soleus izmokban (5.ábra). Továbbá soleus izomban mindkét összehúzódnás típus rövidült. Eredményeink tisztán mutatják, hogy a statin adása ezekben az állatokban myopathiát okozott, amely csökkent izomerőben és emelkedett plazma CK szintben nyilvánult meg (Füzi et al, 2011).



5. ábra Erő transziensek thiouracillal kezelt (TU), hiperkoleszterinémiás (HC) és statinnal kezelt hiperkoleszterinémiás (HC&S) patkányok izmain

Egyedi összehúzódások 2 ms hosszú szupramaximális ingerléssel kiváltva EDL (A) és soleus (B) izmon (TU pontozott, HC szaggatott, HC&S folyamatos vonal). Tetanuszok szupramaximális 200 Hz-es 200 ms hosszú (EDL, C) és 100 Hz-es 300 ms hosszú (soleus, D) ingerléssel kiváltva.

Közlemények

Fodor J., Gonczi M., Sztretye M., Dienes B., Olah T., Szabo L., Csoma E., Szentesi P., Szigeti GP., Marty I., Csernoch L.: Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture., *Journal of Physiology* 586, 5803-5818, 2008. IF: 4,649

Oddoux S., Brocard J., Schweitzer A., Szentesi P., Giannesini B., Brocard J., Fauré J., Pernet-Gallay K., Bendahan D., Lunardi J., Csernoch L., Marty I.: Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function, *Journal of Biological Chemistry*, 284:34918-34929., 2009. IF: 5,328

Fuzi M., Palicz Z., Vincze J., Cseri J., Szombathy Z., Kovacs I., Olah A., Szentesi P., Kertai P., Paragh G., Csernoch L: Fluvastatin-induced alterations of skeletal muscle function in hypercholesterolaemic rats., *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 32(6):391-401, 2011. IF: 1,933

Oláh T, Fodor J, Oddoux S, Ruzsnavszky O, Marty I, Csernoch L.: Trisk 32 regulates IP(3) receptors in rat skeletal myoblasts., *Pflügers Archive* 462(4):599-610., 2011. IF: 3,354

Oláh T, Fodor J, Ruzsnavszky O, Vincze J, Berbey C, Allard B, Csernoch L.: Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store

operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells., *Cell Calcium* 49(6):415-425, 2011. IF: 3,553